

PCT

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale No. PCT/FR 03/03860	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22.12.2003	Date de priorité (jour/mois/année) 23.12.2002
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/62		
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.

2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

- ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 6 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- I ☒ Base de l'opinion
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 12.07.2004	Date d'achèvement du présent rapport 17.03.2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Espen, J N° de téléphone +49 89 2399-8410 

PCT/FR 03/03860

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n°

PCT/FR 03/03860

- ☐ des revendications, nos :
- ☐ des dessins, feuilles :
5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport.)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté

Oui: Revendications 1-33

Non: Revendications

Activité inventive

Oui: Revendications 1-33

Non: Revendications

Possibilité d'application industrielle

Oui: Revendications 1-33

Non: Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants :

D1 : DE WAARD MICHEL ET AL: "Properties of the alpha-1-beta Anchoring Site in Voltage-dependent Ca-2+ Channels" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 270, no. 20, 19 mai 1995 (1995-05-19), pages 12056-12064, XP002198860 ISSN: 0021-9258

1). La présente demande internationale a trait à une protéine chimérique dérivée d'un canal calcique haut seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID (beta interaction domaine, description, page 3), fusionnée à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID.

1.1). Au vu des documents cités dans le Rapport International de Recherche, l'objet des revendications 1-33 est nouveau (Art. 33 (2) PCT).

1.2). Les revendications 1-33 satisfont également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne l'activité inventive (Art. 33 (3) PCT).

D1 qui est considéré comme étant l'art antérieur le plus proche de la revendication 1, décrit une protéine chimérique comprenant le domaine d'interaction α_1 (AID_{α_1}) d'un canal calcique haut seuil fusionné à la protéine glutathione S transférase.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que la protéine chimérique comprend une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID dérivé d'un canal calcique haut seuil.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme de fournir des outils pour l'étude des voies de signalisation cellulaire dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et l'identification de composés modulant l'activité des protéines G.

La protéine chimérique de la revendication 1 qui n'était ni décrite ou suggérée dans l'

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Demande internationale n° PCT/FR 03/03860

art antérieur résout d' une manière surprenante le problème décrit ci-dessus.

Le commentaire fait ci-dessus est aussi valable pour les revendications 2-33.

REVENDEICATIONS

1°) Protéine chimérique dérivée d'un canal calcique haut seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID, fusionné(e) à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID.

2°) Protéine chimérique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une sous-unité β fusionnée à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

3°) Protéine chimérique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par le domaine *GK-like* d'une sous-unité β fusionné à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

4°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la sous-unité β ou son fragment et la boucle I-II ou son fragment sont séparés par un peptide espaceur.

5°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est issue d'un canal calcique haut-seuil sensible aux protéines G.

6°) Protéine chimérique selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend la boucle I-II d'une sous-unité α_1 sélectionnée parmi α_{1A} , α_{1B} et α_{1E} ou un fragment de celle-ci.

7°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend une sous-unité β sélectionnée dans le groupe constitué par β_1 , β_2 , β_3 et β_4 ou un fragment de celle-ci.

8°) Protéine chimérique variant issue d'une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation d'au moins un acide aminé dans les séquences de la dite sous-unité β et/ou de la boucle I-II d'une sous unité α_1 .

9°) Protéine chimérique variant selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite mutation modifie l'affinité de la sous-unité β pour le fragment de la boucle I-II de la sous-unité α et/ou réciproquement.

5 10°) Protéine chimérique variant selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisée en ce que lesdites mutations sont sélectionnées parmi les mutations suivantes du domaine AID de la boucle I-II de la sous-unité α_1 : Q383A, Q384A, E386D, E386S, L389H, G391R, Y392S, Y392F, W395A, I396A et E400A.

10 11°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est couplée, de préférence de manière covalente, à au moins un marqueur approprié permettant la détection et/ou la purification et/ou l'immobilisation de ladite protéine.

12°) Protéine chimérique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend un fluorophore accepteur ou donneur respectivement à son extrémité NH_2 et/ou COOH .

15 13°) Protéine chimérique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le fluorophore accepteur est la protéine fluorescente CFP ou BFP et le fluorophore donneur est la protéine fluorescente GFP ou YFP.

20 14°) Peptide, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'au moins 7 acides aminés de la séquence de la protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, lequel fragment incluant au moins les 7 acides aminés situés à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

25 15°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre un peptide selon la revendication 14 et en ce qu'ils reconnaissent exclusivement la protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

30 16°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou un peptide selon la revendication 14, et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

17°) Sondes et amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

5 18°) Amorces aptes à amplifier la sous-unité β et/ou la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou leurs fragments tels que définis à la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 8 et 9.

10 19°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un insert sélectionné dans le groupe constitué par les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16.

20°) Vecteur recombinant selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur d'expression eucaryote présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 10.

21°) Cellules modifiées par un vecteur recombinant selon la revendication 19 ou 20, par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 16 ou par une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

20 22°) Cellules modifiées selon la revendication 21, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules eucaryotes.

23°) Cellules modifiées selon la revendication 21 ou la revendication 22, caractérisées en ce qu'elles expriment au moins un récepteur capable de se lier aux protéines G.

25 24°) Mammifère transgénique non-humain, caractérisé en ce que tout ou partie de ses cellules sont transformées par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 16.

30 25°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains

selon la revendication 24, pour l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

26°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24 pour le criblage d'agonistes et/ou d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

27°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24 pour le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil.

28°) Méthode d'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₁) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine G selon la revendication 23,

b₁) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié, et

c₁) la détermination, par tout moyen approprié, de la proportion de ~~protéine~~ protéine chimérique exprimée dans lesdites cellules qui est liée à une sous-unité G $\beta\gamma$.

29°) Méthode de criblage d'agonistes/d'antagonistes des voies de ~~signalisation~~ et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₂) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé aux protéines G selon la revendication 23,

5 b₂) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéines G, par tout moyen approprié,

c₂) la détermination comparative, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans les cellules qui est liée à une sous-unité Gβγ, avant et après la mise en contact desdites cellules en b₂) avec une molécule à tester, et

10 d₂) l'identification des molécules agonistes/antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, correspondant à celles capables respectivement d'augmenter et de diminuer la concentration cellulaire en sous-unités Gβγ libres.

15 30°) Méthode selon la revendication 28 ou la revendication 29, caractérisée en ce que lesdites cellules modifiées en a₁) ou en a₂) expriment une protéine chimérique couplée, à ses extrémités NH₂ et COOH, respectivement à un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur de fluorescence et ladite détermination en c₁) ou en c₂) est effectuée par la technique de transfert de fluorescence (FRET).

20 31°) Méthode de criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α₁ et β des canaux calciques haut-seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

25 a₃) la mise en contact d'une molécule à tester avec une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible ou insensible aux protéines G selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, et avec un peptide comprenant le domaine AID d'une sous-unité α₁ insensible aux protéines G,

b₃) la mesure, par tout moyen approprié, de la liaison de ladite protéine chimérique audit peptide, et

c₃) l'identification des antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β , correspondant à ceux avec lesquels on observe une liaison de ladite protéine chimérique audit peptide.

5 32°) Méthode de criblage selon la revendication 31, caractérisée en ce que ledit peptide comprenant le domaine AID est immobilisé sur un support solide et ladite protéine chimérique est une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13.

10 33°) Trousse pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 28 à 32, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24.